

令和元年6月10日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K08651

研究課題名(和文) クームス陰性自己免疫性溶血性貧血の網羅的診断システムの確立

研究課題名(英文) A Comprehensive Diagnostic Algorithm for Direct Antiglobulin Test-Negative Autoimmune Hemolytic Anemia

研究代表者

亀崎 豊実 (Kamesaki, Toyomi)

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号：90316513

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,500,000円

研究成果の概要(和文)：自己免疫性溶血性貧血(AIHA)の約1割はクームス試験(DAT)が陰性を示し、DAT感度以下の赤血球結合IgGが主な原因とされるが、IgM/IgA型自己抗体や低親和性IgG自己抗体も原因となる。各病態の頻度については不明で、包括的な診断法も確立されていなかった。今回、全国レベルで症例集積し、3つの病態を一括して解析した。網羅的診断システムを確立し、各病態の頻度が明らかになった。DAT陰性AIHAの8割程度はDAT感度以下のIgG自己抗体が赤血球に結合しており、他に低親和性IgG自己抗体がDAT陰性AIHAの15%程度に検出され、IgAもしくはIgM自己抗体がそれぞれ4%程度検出された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

全国で数百例程度の希少疾患であるクームス陰性AIHAの3つの発症機序について、1つの研究室に症例検体を集約して解析することにより、3つの機序を考慮した包括的な診断方法を確立し、それぞれの頻度を明らかにした。また、従来の検査法を組み合わせることにより、新たな分類を見出し、診断分類として提唱した。今後それぞれの診断分類における臨床的な特徴や予後などの解析を行う上で、基礎的なデータが得られたと考える。

研究成果の概要(英文)：Direct antiglobulin test (DAT)-negative warm autoimmune hemolytic anemia (AIHA) is mainly caused by three mechanisms: red blood cell (RBC)-bound immunoglobulin (Ig)G below the detection limit of routine DAT; RBC bound IgA or IgM; or low-affinity autoantibodies. Although most cases of DAT-negative AIHA are thought to be caused by RBC-bound IgG, and combinatory serological analyses are recommended, the relative ratios of each mechanism have not been clarified. The patients with undiagnosed hemolytic anemia and negative conventional tube method-DAT (TM-DAT) were investigated using anti-IgA and anti-IgM sera, and column agglutination method-DAT (CM-DAT), in addition to radioimmunological quantitation of RBC-bound IgG. Relative ratios of patients with DAT-negative AIHA resulting from RBC-bound IgG, RBC-bound IgA, RBC-bound IgM, and low-affinity IgG were estimated as 80, 4, 1 and 15%, respectively. A new classification and diagnostic algorithm for DAT-negative AIHA were proposed.

研究分野：免疫血液学

キーワード：溶血性貧血 自己免疫 血清学

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

自己免疫性溶血性貧血(AIHA)の約1割はクームス試験が陰性を示し、クームス陰性AIHAと呼ばれており、クームス試験感度以下の赤血球結合IgGが主な原因と考えられている。全国で数百人の稀少疾患であるが、赤血球結合IgG定量検査を行っている当研究室に症例が集積している。当研究室では、集積した症例データベースから、結合IgG量の診断カットオフ値、臨床的特徴、治療反応性や短期予後を明らかにしてきた。IgM/IgA型自己抗体や低親和性IgG自己抗体もクームス陰性の原因となるが、各病態の頻度については不明で、包括的な診断法も確立されていなかった。

2. 研究の目的

全国から原因不明溶血性貧血患者の精査を受け付け、クームス陰性AIHA症例を全国レベルで集積し、3つの病態(クームス試験感度以下の赤血球結合IgG、IgA/IgM型自己抗体、低親和性IgG自己抗体)を一括して解析することにより、クームス陰性AIHAの網羅的診断システムを確立すると共に各病態の頻度を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1)検査検体と臨床情報

溶血性貧血の精査を希望する医療機関において、検査依頼ホームページ <http://aiha.a.la9.jp/AIHA/index.html> より、研究同意書をダウンロードし、対象溶血性貧血患者より文書で研究同意を受けて、同意書はそのまま各施設で保管していただいた。当該患者の検査用に採血された末梢血液の残余検体(EDTA血)を4の状態(室温)で当研究室へ送付いただいた。同様にダウンロードした臨床研究承諾書と赤血球結合IgG定量依頼票(患者臨床情報)を各施設で作成し、患者の個人情報(匿名化)した後に、検体とともに当研究室へ送付いただいた。

(2)検査方法

送付された末梢血液検体から赤血球を分離・洗浄し、検査に用いた。

広範囲直接クームス検査(Direct Coombs test: Direct antiglobulin test: DAT)と特異的直接クームス検査については、抗IgG、抗IgA、抗IgM、抗補体特異的クームス試験は試験管法で行い、抗IgG特異的クームス試験についてはカラム法でも行った。

赤血球結合IgG量については、RIA法を用いて定量した。

(3)臨床情報アンケート

赤血球結合IgG量とクームス試験結果は主治医へ速やかに報告し、診療に活用していただいた。検査依頼から約1年後に主治医へアンケートを行い、臨床診断や治療反応性、予後の調査をおこなった。

4. 研究成果

平成27年から平成29年度の3年間に、322例の検査を行った。その内訳は、年齢は0.1歳から94歳(平均は56歳)、男女比43%/57%、直接クームス試験陰性例は297例(92%)であった。赤血球結合IgG定量値としては1-1091IgG分子/赤血球で、クームス試験感度以下のIgG結合量の症例は162例(55%)、抗IgAクームス試験陽性は29例(10%)、抗IgMクームス試験陽性は31例(10%)であった。また、カラム法による抗IgGクームス試験は88例で陽性となり、赤血球洗浄後に55例で陰性化したことから、19%に低親和性IgG自己抗体の関与が疑われた。

検査の1年後に主治医に対して行った、臨床診断や治療反応性、予後についてのアンケート調査において、回答は153例(48%)、未回答は168例(52%)であった。回答群と未回答群で、男女比と年齢を比較すると、男女比(%)はそれぞれ45/55、42/58であり(p=0.54)、年齢(歳±標準偏差)は57±45、56±24であり(p=0.91)、統計的な有意差はなかった。

本研究結果の解析より、クームス陰性AIHAの8割程度はクームス試験感度以下のIgG自己抗体が赤血球に結合しており、他に低親和性IgG自己抗体がクームス陰性AIHAの15%程度に検出され、IgAもしくはIgM自己抗体がそれぞれ4%程度検出された(表1)。

今回の解析結果を基に、クームス陰性AIHAの3病型の頻度と臨床的特徴について解析をおこない、その結果を考慮した「クームス陰性AIHA診断フローチャート」(図1)と「クームス陰性AIHAの分類表」(表1)を作成した。すなわち、試験管法DAT陰性の溶血性貧血例でAIHAを

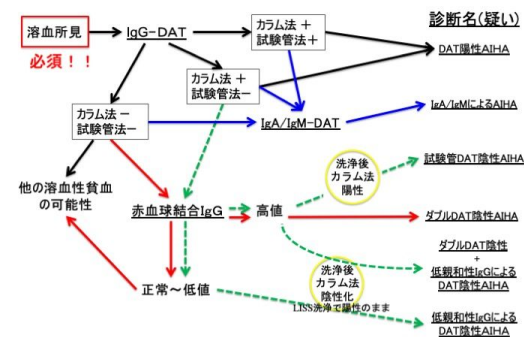


図1. クームス (DAT) 陰性AIHA診断フローチャート

表1. クームス陰性AIHAの分類

	試験管法DAT	カラム法DAT	洗浄後カラム法DAT	赤血球結合IgG量	頻度
試験管DAT陰性	-	+	+	カットオフ値以上	25%
ダブルDAT陰性	-	-	-	カットオフ値以上	55%
低親和性IgG	-	+	- (LISS洗浄で陽性)	低値~正常	15%
ダブルDAT陰性+低親和性IgG	-	+	- (LISS洗浄で陽性)	カットオフ値以上	5%
IgAまたはIgM自己抗体によるAIHA	-	+	+	抗IgAまたは抗IgM血清により、試験管DAT陰性AIHAの各4%にDAT陽性を検出する	

DAT: direct anti-globulin test: 直接クームス試験,
LISS: low ionic strength solution

疑った場合は、カラム法 DAT を行うことにより検出感度が上がり、試験管法とカラム法の両 DAT 陰性例については赤血球結合 IgG 定量を行うと診断できる。生理食塩水や LISS で洗浄後の赤血球を用いてカラム法クームス試験を行うと、低親和性 IgG 自己抗体による温式 AIHA の細分類が可能である(図 1・表 1)。なお、低親和性 IgG 自己抗体による AIHA 症例は、治療反応性や予後が他のタイプのクームス陰性 AIHA 例よりもより良好な傾向にあった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 22 件)

Kamesaki T, Kajii E, A comprehensive diagnostic algorithm for direct antiglobulin test-negative autoimmune hemolytic anemia reveals the relative ratio of three mechanisms in a single laboratory, *Acta Haematol*, 査読有、140 巻、2018、10-17

DOI: 10.1159/000488753

深堀道俊、山口真紀、亀崎豊実、直接抗グロブリン試験陰性の溶血時期を経て自己免疫性溶血性貧血を発症した骨髄異形成症候群、*日本輸血細胞治療学会誌*、査読有、64 巻、2018、534-539

<https://doi.org/10.3925/jjtc.64.534>

亀崎豊実、貧血の読み方・捉え方 実践編：貧血検査データの読み方 症例、*Medical Technology*、査読無、46 巻、2018、1075-1079

亀崎豊実、自己免疫性溶血性貧血患者・不規則抗体陽性患者への輸血、*内科*、査読無、122 巻、2018、799-803

亀崎豊実、直接抗グロブリン試験陽性化の機序と臨床、*血液事業*、査読無、41 巻、2018、97-98

亀崎豊実、私の処方 2018 血液疾患の処方 溶血性貧血、*小児科臨床*、査読無、71 巻、2018、271-278

亀崎豊実、自己免疫性溶血性貧血の診断と治療-最新の展開、*血液内科*、査読無、76 巻、2018、51-58

中村こずえ、山本美佳智、小山隆之、三牧正和、亀崎豊実、低親和性自己抗体の関連が疑われたクームス陰性自己免疫性溶血性貧血の一例、*The Japanese Journal of Pediatric Hematology/Oncology*、査読有、54 巻、2017、433-437

doi:10.11412/jspho.54.433

竹村悠太、水牧裕希、齋藤千鶴、杉盛千春、小谷岳春、亀崎豊実、山口正木、Coombs 陰性自己免疫性溶血性貧血の 1 例、*石川県立中央病院医学誌*、査読有、39 巻、2017、15-16

亀崎豊実、溶血性貧血 (AIHA と PNH)、*医学と薬学*、査読無、74 巻、2017、1035-1046

亀崎豊実、One Point Advise 小球性と Mentzer index、*Medical Practice*、査読無、34 巻、2017、1044

亀崎豊実、臨床血液学-最新情報と今後の展望 2017 (赤血球型疾患) 自己免疫性溶血性貧血の診断と治療の進展、*臨床血液*、査読有、58 巻、2017、329-335

<https://doi.org/10.11406/rinketsu.58.329>

Hagiwara K, Kamesaki T, Kakimoto T, Fukushima K, Tamaki T, Long-term followup of non-syphilitic paroxysmal cold hemoglobinuria in an adult, *Ann Hematol*、査読有、95 巻、2016、1547-1549

DOI 10.1007/s00277-016-2717-8(June)

亀崎豊実、自己免疫性溶血性貧血の治療、*Medical Practice*、査読無、33 巻、2016、1437-1442

亀崎豊実、自己免疫性溶血性貧血の診断と治療、*血液内科*、査読無、73 巻、2016、155-162

永井正、上原英輔、斉藤桐子、亀崎豊実、小澤敬也、室井一男、神田善伸、骨髄異形成症候群に合併したクームス陰性自己免疫性溶血性貧血、*日本輸血細胞治療学会誌*、査読有、61 巻、2015、468-473

<https://doi.org/10.3925/jjtc.61.468>

Honne K, Nagashima T, Iwamoto M, Kamesaki T, Minota S, Glucocorticoid-Responsive Cold Agglutinin Disease in a Patient with Rheumatoid Arthritis, *Case Reports in Rheumatology*、査読有、2015、4 pages

DOI: 10.1155/2015/823563

亀崎豊実、溶血性貧血診療の診断と治療、*臨床血液*、査読有、56 巻、2015、1894-1902

<https://doi.org/10.11406/rinketsu.56.1894>

亀崎豊実、自己免疫性溶血性貧血診療の分子病態、*臨床血液*、査読有、56 巻、2015、846-854

<https://doi.org/10.11406/rinketsu.56.846>

亀崎豊実、腫瘍随伴症候群としての自己免疫性溶血性貧血、*臨床血液*、査読有、56 巻、2015、778-784

<https://doi.org/10.11406/rinketsu.56.778>

① 亀崎豊実、内科疾患の診断基準・病型分類・重症度 溶血性貧血、*内科*、査読無、115 巻、2015、1304-1307

② 亀崎豊実、溶血性貧血、*小児科臨床*、68 巻、査読無、2015、785-791

〔学会発表〕(計 22 件)

- 亀崎豊実、溶血性貧血の基礎と病型診断に関わる臨床検査のポイント、日本検査血液学会、2018
- 大峠ふくみ、山城安啓、メラフェラニア、天尾優希、緒方静、木本真史、森健太郎、亀崎豊実、服部幸夫、フローサイトメトリーによる赤血球結合 IgG 定量法の確立、日本血液学会、2018
- 北尾章人、川本晋一郎、早川郁代、倉田啓史、山崎隆、松岡広、角泰雄、掛地吉弘、亀崎豊実、南博信、Flow cytometric measurement of erythrocyte membrane-bound IgG: A potential diagnostic method for colorectal carcinoma、日本臨床腫瘍学会、2018
- Kitao A, Kawamoto S, Kurata K, Hayakawa I, Matsuoka H, Sumi Y, Kakeji Y, Kamesaki T, Minami H, Flow cytometric measurement of increase in erythrocyte-bound IgG: A potential diagnostic method for colorectal carcinoma、AACR Annual Meeting 2018 in Chicago、2018
- 森拓人、小野祐一郎、楠本寿子、石川隆之、亀崎豊実、著明な赤血球自己凝集を伴う温式自己免疫性溶血性貧血を合併した骨髄異形成症候群、日本血液学会、2018
- 亀崎豊実、直接抗グロブリン試験陽性化の機序と臨床、日本血液事業学会、2017
- 亀崎豊実、直接クームス試験陰性時の AIHA 診断について、日本輸血・細胞治療学会、2017
- 亀崎豊実、クームス試験陰性自己免疫性溶血性貧血の病態と診断、長崎血液疾患懇話会、2017
- 大峠ふくみ、山城安啓、Mella Ferania、天尾優希、緒方静、木本真史、森健太郎、亀崎豊実、服部幸夫、フローサイトメトリー解析による赤血球結合 IgG 測定法の確立、日本血液学会、2017
- 深堀道俊、山口真紀、亀崎豊実、直接グロブリン試験陰性の溶血時期を経過後に陽転化した自己免疫性溶血性貧血を合併した骨髄異形成症候群、日本輸血・細胞治療学会、2017
- 匹田さやか、堤明純、竹島太郎、亀崎豊実、中村好一、西日本の離島における骨髄異形成症候群、日本疫学会、2017
- 亀崎豊実、カラム法直接クームス試験を利用したクームス陰性自己免疫性溶血性貧血の網羅的診断法の開発、日本輸血・細胞治療学会、2016
- 亀崎豊実、クームス試験陰性の溶血性貧血から AIHA を診断するには、東北 PNH 研究会、2016
- 亀崎豊実、自己免疫性溶血性貧血の診断と治療、血液腫瘍シンポジウム 2016、2016
- 中森義季、山城安啓、Ferania Mella、天尾優希、大峠ふくみ、中井充、緒方静、木本真史、森健太郎、亀崎豊実、フローサイトメトリーを用いた高感度赤血球結合 IgG 測定法の確立、日本分子生物学会、2016
- 亀崎豊実、溶血性貧血について、日本輸血・細胞治療学会、2015
- 亀崎豊実、溶血性貧血の診断と治療、日本血液学会、2015
- 亀崎豊実、プライマリケア医に必要な貧血の診断と治療、上越コミュニティーメディスン研究会、2015
- 中村こずえ、山本美佳智、小山隆之、小林茂俊、亀崎豊実、通常のクームス検査では陰性であった慢性自己免疫性溶血性貧血、日本小児血液がん学会、2015
- 桐原健彦、貝梅紘子、武田 航、栗原太郎、佐藤慶二郎、植木俊充、廣島由紀、住 昌彦、上野真由美、市川直明、亀崎豊実、小林 光、A case of Coombs-negative IgA-mediated autoimmune hemolytic anemia、日本血液学会、2015
- ① 山崎正博、皆方大佑、佐藤一也、亀崎豊実、室井一男、神田善伸、肺炎球菌性肺炎を契機に発症した mixed AIHA、日本血液学会、2015
- ② 小林弘典、笠見卓哉、片桐隆幸、根本洋樹、河本啓介、牛木隆志、柴崎康彦、森山雅人、瀧澤淳、成田美和子、曾根博仁、亀崎豊実、増子正義、PNH 型赤血球の出現を合併した Evans 症候群の 1 例、日本血液学会学、2015

〔図書〕(計 13 件)

- 亀崎豊実、カイノス、クームス陰性自己免疫性溶血性貧血の診療ハンドブック、2018、86
- 亀崎豊実、技術情報協会、疾患・病態検査・診断法の開発、2017、404-413
- 亀崎豊実、最新医学社、診断と治療の ABC 貧血症、2017、107-115
- 亀崎豊実、日本医事新報社、私の治療 2017-18 年度版、2017、689-691
- 亀崎豊実、日本臨床社、貧血学-最新の診断・治療動向、2017、455-459、478-483
- 亀崎豊実、中外医学社、EBM 血液疾患の治療 2017-2018、2016、57-64
- 亀崎豊実、診断と治療社、血液科研修ノート、2016、229-237
- 亀崎豊実、学研、難病事典、2015、301-307
- 亀崎豊実、医薬ジャーナル社、診療の手引きと臨床データ集 血液疾患診療ハンドブック改訂 3 版、2015、79-92
- 亀崎豊実、日本臨床社、免疫症候群(第 2 版)-その他の免疫疾患を含めて、2015、295-299
- 亀崎豊実、中山書店、最新ガイドライン準拠血液疾患診断・治療指針、2015、167-174
- 亀崎豊実、中外医学社、内科外来処方 navi、2015、94
- 亀崎豊実、医学書院、今日の治療指針 2015、2015、647-649

〔その他〕
ホームページ等

<http://aiha.a.la9.jp/AIHA/index.html>

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。